

## 請求の範囲

[1] 核酸を増幅する方法において、

(A) 下記 (a) 又は (b) から選択される反応混合物を調製する工程、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、

(b) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、およびRNaseH、  
ここで、一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマーはラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーとして作用し、

ここで、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されており、

上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に相補的な第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと、鋳型となる核酸の塩基配列に相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2種類を含んでおり、

上記ラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該第一キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相補的な領域および／またはその領域より3'側の塩基配列に相補的な配列を有し、鋳型となる核酸と相同的な第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有し、

および

(B) 鋳型となる核酸へのプライマーの特異的なアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長鎖合成反応及び鎖置換反応、並びにRNaseHによる伸長鎖の切断反応が行える一定の温度条件でラダー状増幅産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

- [2] 鋳型となる核酸がRNAであり、当該核酸をあらかじめデオキシリボヌクレオチド3リン酸、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ及び少なくとも1種類のラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーで処理し、逆転写産物とする、請求項1記載の方法。
- [3] 工程(A)における反応混合物がさらに逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを含有する、請求項1記載の方法。
- [4] 鋳型となる核酸がmRNAであることを特徴する、請求項2又は3記載の方法。
- [5] 逆転写活性と鎖置換活性とを有する1つのDNAポリメラーゼが、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼおよび鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして作用することを特徴とする、請求項2又は3記載の方法。
- [6] 請求項1記載の核酸の増幅方法のための組成物であって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物。
- [7] 請求項1記載の核酸の増幅方法のためのキットであって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び／又はラダー形成オリゴヌクレオチドプライマーを含有するキット。
- [8] 下記工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法；
  - (a) 請求項1記載の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および、
  - (b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程。
- [9] 請求項1記載の核酸の増幅方法に用いるプライマーであって、鋳型となる核酸と相同的なプライマーの5'側の塩基配列、鋳型となる核酸の当該第二キメラオリゴヌクレオチドプライマーと相同な領域の5'末端よりさらに5'側方向の領域に相当する塩基配列あるいはその両方に相補的な配列を5'側に有することを特徴とするオリゴヌクレオチドプライマー。